

## 活性化リンパ球の造血幹細胞におよぼす影響 —Concanavalin A 誘導 suppressor T cell による赤芽球系前駆細胞の抑制—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任：服部絢一教授)

近 藤 邦 夫

(昭和58年12月26日受付)

最近、造血幹細胞に対する免疫担当細胞、特にリンパ球の調節が注目されている。このようなリンパ球の造血調節機構に関与するメカニズムを明らかにするため、今回われわれは、免疫反応に抑制的に作用する suppressor cells を誘導することでよく知られている concanavalin A (以下 Con A と略す) で活性化されたリンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響について検討し、造血抑制性細胞の性状を明らかにした。Con A 刺激細胞と骨髓単核球の coculture で赤芽球系前駆細胞である erythroid colony forming unit (CFU-E) と erythroid burst forming unit (BFU-E) に対する影響を methyl-cellulose 法でおこない以下の結果を得た。Con A 刺激 CFU-E & BFU-E/suppressor cell は Con A 濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  で培養時間が 48 時間の条件で最も強い抑制を示し、CFU-E, BFU-E をともに dose dependent に抑制した。抑制機序は液性因子を介したもので cell-to-cell interaction を必要とせず、また骨髓マクロファージや骨髓 T 細胞はその抑制に関与しない。この抑制細胞は X 線感受性 T 細胞で、抑制発現に human leukocyte antigen (HLA) の一致を必要としない。さらに T 細胞サブセットに対する monoclonal 抗体での検索では免疫反応に抑制的に働く T 細胞と同様に OKT 3, OKT 8 陽性細胞であることが明らかとなった。また免疫反応に抑制的に働く T 細胞サブセットの precursor cell は OKT 4 rich fraction と OKT 8 rich fraction の両方の分画に存在するのに比べ、造血幹細胞に抑制的に働く T 細胞サブセットの precursor cell は主に OKT 8 rich fraction に存在することが明らかとなった。しかし、免疫反応系と造血幹細胞のそれぞれに抑制的に作用する T 細胞サブセットが全く同一か、または同じ phenotype を有するが異なったサブセットかどうかについては、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

---

**Key words** Concanavalin A, Suppressor cell, Erythroid progenitor cell, Monoclonal antibody

---

近年 in vitro colony 法による造血幹細胞の定量的測定法が確立されたことによって、造血幹細胞に関する研究は著しい進歩をとげてきた。個々の血球系にすでに方向づけられてきた committed 幹細胞である colony forming unit in culture (以下 CFU-C と略す)<sup>1)</sup>, erythrocytic colony forming unit (以下 CFU-E と略す)<sup>2)</sup>, erythrocytic burst forming unit (以下 BFU-E と略す)<sup>3)</sup> や Megakaryocytic colony form-

ing unit (以下 CFU-M と略す)<sup>4)</sup> だけでなく多能性幹細胞と考えられる mixed colony forming unit (以下 CFU-Mix と略す)<sup>5)</sup> の測定も可能となっている。したがって、再生不良性貧血 (以下再不貧と略す) や白血病などの種々の造血異常を示す疾患ではそれぞれの病態が造血幹細胞レベルで把握できるようになってきている。さらに最近では、このような造血幹細胞研究の進歩を背景として造血幹細胞の分化増殖の調節機構に

---

Effects of Activated Lymphocytes on Hematopoietic Stem Cells: Suppression of Erythroid Progenitor Cells by Concanavalin A Induced Suppressor T cells. **Kunio Kon-do**, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

免疫学的機序が関与していることが明らかにされつつあり、造血調節機構における regulatory cell としてのリンパ球の役割が注目されている。すでに、再不貧の一部ではその病態発症に自己造血幹細胞に対する免疫学的な機序による障害が関与することを示す成績が得られており、たとえば再不貧患者末梢血単核細胞や骨髓細胞を正常骨髓細胞に添加し混合培養すると、正常骨髓の幹細胞の分化、増殖が強い抑制<sup>9)~11)</sup>を受けたり、また再不貧患者骨髓から T 細胞または単球<sup>9)</sup>を除去することにより低下していた幹細胞が増加することが報告されている。さらに再不貧患者細胞を anti-thymocyte globulin (以下 ATG) と略す) と補体<sup>10)11)</sup>で処理したり、あるいは患者骨髓細胞に副腎皮質ホルモンを添加して培養<sup>12)</sup>することにより CFU-C や CFU-E の形成抑制が解除されるという成績が報告されており、これらの成績は自己造血幹細胞を抑制する T リンパ球あるいは単球などが存在していることを示唆している。

一方、臨床的には再不貧に対し cyclophosphamide<sup>13)~15)</sup>, ATG<sup>16)~18)</sup>, 副腎皮質ホルモン大量投与<sup>19)</sup>などの免疫抑制療法が試みられ、多数の有効例が報告されている。これらの臨床的研究においては、colony assay 系で明らかにされる suppressor cell の存在は必ずしも臨床例における免疫抑制療法の治療効果と相関しない<sup>20)</sup>といわれているが、少なくとも再不貧の一部の症例では、免疫学的機序によって汎血球減少という病態が発症することが強く示唆される。しかしながら、造血幹細胞の分化増殖に抑制的に作用する免疫学的機序、とくに抑制作用を示す suppressor cells についてはその発現メカニズム、免疫学的特徴、有効な抑制効果を発揮する液性因子など詳細な検討はなされていない現状であり、不明な点も少なくない。

そこで本研究では、造血幹細胞に regulatory cells として働くリンパ球サブセットと、その作用機序を明らかにするため、suppressor T cell を誘導することでよく知られている concanavalin A (以下 Con A と略す)<sup>21)</sup>によって活性化されたリンパ球の造血幹細胞とくに赤芽球系前駆細胞である BFU-E、および CFU-E におよぼす影響を種々の角度から検討し、興味ある結果を得たので報告する。

#### 材料および方法

##### I. 末梢血単核球と T 細胞の分離

健康成人から得たヘパリン加静脈血を Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって分離し、RPMI-1640 培養液で 3 回洗浄して、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, 以下 PBMC と略す) を得

た。

T 細胞の分離は羊赤血球 (sheep red blood cells, 以下 SRBC と略す) とのロゼット形成性を利用した。まず、ノイラミダーゼ (Behring werke, Mannheim, West Germany) 処理 SRBC と前述の方法で得られた PBMC を、非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, Flow laboratory, Lot. No. 70330, 以下 FCS と略す) を 40% 含む RPMI-1640 培養液にそれぞれ  $1 \times 10^6$ /ml と  $5 \times 10^6$ /ml の濃度に調整し、それぞれ等量を混合し、200 g, 5 分間遠心後、4°C, 60 分以上静置し、SRBC とロゼットを形成させた (E ロゼット)。その後 pellet を静かに再浮遊させ、Ficoll-Hypaque に静かに重層した。400 g, 30 分遠心後、境界にバンドを形成したロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄してこれを non-T 細胞とした。一方ロゼット形成細胞を含む pellet は tris-NH<sub>4</sub>Cl buffer で溶血させ、3 回洗浄してこれを T 細胞とした。このようにして得られた T 細胞の E ロゼット陽性細胞は 90% 以上であった。

##### II. 骨髓単核細胞の分離

健康成人または鉄欠乏性貧血などの患者から採取したヘパリン加骨髓穿刺液より骨髓単核細胞 (bone marrow mononuclear cells, 以下 BMMNC と略す) を Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって分離し、ペニシリン G 100 units/ml, ストレプトマイシン 100 µg/ml 加  $\alpha$ -medium (Flow laboratory) で 3 回洗浄して実験に用いた。

マクロファージを除いた非付着性骨髓単核細胞 (non-adherent BMMNC) を使用する場合は BMNC を 10% FCS 加  $\alpha$ -medium で  $5 \times 10^6$ /ml の濃度に調整し、60 mm プラスチックシャーレ (Falcon # 3030) に入れ、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 30 分間静置後、浮遊細胞を集めることによって大部分のマクロファージを含む付着細胞を除去した。

T 細胞除去骨髓単核細胞 (T cell-depleted BMMNC) は BMMNC と SRBC を 40% FCS 加 RPMI-1640 培養液で、それぞれ  $5 \times 10^6$ /ml と  $1 \times 10^6$ /ml の濃度に調整し、I と同様の方法により、ロゼット非形成細胞を採取し、3 回洗浄して得た。また、このようにして得られた T cell-depleted BMMNC 中の T 細胞混入率は 10% 以下であった。

一部の実験では、既報<sup>22)</sup>の方法であらかじめ -196°C の液体窒素中に保存しておいた BMMNC を使用した。

##### III. Concanavalin A 刺激細胞及び培養上清の作製

PBMC, T 細胞, non-T 細胞を 15% FCS 加 RPMI-1640 培養液に  $1 \times 10^6$ /ml となるように調整し、それぞれに Con A (Sigma pharmaceutical, Lot. No. 71

F-7190) を  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加して、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  の条件で 48 時間培養した。培養遠心により培養上清を採取し、使用時まで  $-20^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。Pellet に含まれる Con A 刺激細胞は 3 回洗浄後、 $0.3\%$  トリパンブルーを用いた色素排泄試験によって viable cell を算定し、以下の実験に用いた。得られた Con A 刺激細胞の viability は  $95\%$  以上であった。

#### IV. CFU-E, BFU-E assay

CFU-E assay BFU-E assay は Iscove らの方法<sup>23)</sup>を一部改変した methyl cellulose 法によって行った。骨髓細胞の濃度は、BMMNC の場合は  $2 \times 10^5/\text{ml}$ 、non-adherent BMMNC および T cell-depleted BMMNC の場合は  $1 \times 10^5/\text{ml}$  に調整し、 $30\% \text{FCS}$  と erythropoietin (Connought Lab. step III, 以下 Epo と略す) を 1 単位添加した。これに Con A 刺激細胞、あるいは培養上清を適当な濃度に添加後、最終濃度  $0.8\%$  となるように methyl cellulose を加え、総量  $1 \text{ ml}$  として  $35 \text{ mm}$  のプラスチックシャーレ (Falcon # 3010) に入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  にて 14 日間培養した。BFU-E assay を行う場合は、CFU-E assay 系に burst promoting activity (BPA) として  $5\% \text{PHA}$  stimulated leukocyte conditioned medium (PHA-LCM)<sup>24)</sup>を添加した。培養終了後、倒立顕微鏡 (Olivus. Model CK) 下で 7 日目に  $8 \sim 50$  個の細胞からなる colony を CFU-E とし、14 日目に  $50$  個以上の細胞からなる colony または  $3$  個以上の subcolony よりなる細胞集団を BFU-E として算出した。培養はいずれの場合も triplicate で行った。各コロニーはマイクロピペットでとりだしペンチジンおよびヘマトキシリン染色で染まる細胞より構成されていることを確認した。成績は Con A 刺激細胞も培養上清も加えずに BMMNC 単独で培養した場合のコロニー数をコントロールとして  $\% \text{of control}$  で示した。

#### V. 抗体処理

抗体処理には anti-human lymphocyte globulin (AHLG, Hoechst), 末梢血 T 細胞に対するモノクローナル抗体 T 101 (UCLA Dr. Gale より供与)<sup>12)</sup>, OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKIa<sub>1</sub> (Ortho Diagnostic System)<sup>26)</sup>を使用した。Con A 刺激細胞は  $1 \times 10^7/\text{ml}$  の濃度に調整し、その  $0.2 \text{ ml}$  に、ALG および T 101 は  $100$  倍希釈液  $0.2 \text{ ml}$  に、その他のモノクローナル抗体は原液  $10 \mu\text{l}$  を加え、 $0 \sim 4^\circ\text{C}$  で 30 分間 incubate した。Incubation 終了後、大量の培養液で 1 回洗浄し、上清  $0.5 \text{ ml}$  を残して再浮遊させ、これに予め造血幹細胞に対する毒性のないことを確認したウサギ補体 (Behring werke, Mannheim, West Germany, Lot. No. 029959 A) の 3 倍希釈したものを  $0.5 \text{ ml}$  加えて、

$37^\circ\text{C}$  で 60 分間 incubate した。Incubation 終了後、1 回洗浄し細胞数を再調整せずに、処理前と同じ容量の培養液で再浮遊させた骨髓細胞との coculture に使用した。抗体処理がうまく行われたかどうかを確認するために、処理細胞の一部を採取し  $0.3\%$  トリパンブルーを用いた色素排泄試験により viability を算定した。

次に、Con A 刺激細胞をモノクローナル抗体で処理するのではなく、T 細胞をモノクローナル抗体と補体で処理して得られる T 細胞サブセットに Con A を添加する検討を行った。OKT 4 と補体との処理で得られた細胞を OKT 8 陽性細胞に富む分画 (以下 OKT 8<sup>+</sup> 分画と略す) とし、OKT 8 と補体との処理で得られた細胞を OKT 4 陽性細胞に富む分画 (以下 OKT 4<sup>+</sup> 分画と略す) とした。それぞれの陽性細胞の純度を増すために抗体と補体による処理は、2 回くり返した。このようにして分離採取された各 T 細胞サブセットについて、それぞれ刻当するモノクローナル抗体を用いて反応させた後、FITC 標識マウス Ig 抗体 (Cappel Lab.) を用いる間接蛍光抗体法によって残存する各モノクローナル抗体陽性細胞を算定すると、OKT 4<sup>+</sup> 分画中の OKT 8 陽性細胞の混入率は  $4\%$  以下で OKT 8<sup>+</sup> 分画中の OKT 4 陽性細胞の混入率は  $5\%$  以下であった。得られた OKT 4<sup>+</sup> 分画および OKT 8<sup>+</sup> 分画を RPMI-1640 に  $1 \times 10^5/\text{ml}$  の濃度で浮遊させ、これに Con A  $10 \mu\text{g/ml}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{CO}_2$  で 48 時間培養した。培養終了後、洗浄して  $0.3\%$  トリパンブルーで viability を算定して細胞数の調整をおこない coculture に使用した。

#### IV. X 線照射

Con A 刺激細胞を  $10 \text{ ml}$  の培養液に再浮遊させ、X 線照射装置 (東芝 KXC-18) を用いて  $168.2 \text{ rad/分}$ 、 $12$  分間、計  $2,000 \text{ rad}$  照射後、実験に使用した。

#### VII. 統計学的検討

統計学的検討には t 検定を用いて平均値の有意差検定を行い、 $p < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。

### 成 績

#### I. Con A 刺激細胞の至適培養条件

Con A 刺激細胞作製に際して、添加する Con A の至適濃度を決定するため、PBMNC に Con A を  $0$ 、 $2.5$ 、 $5.0$ 、 $10.0$ 、 $20.0 \mu\text{g/ml}$  の各濃度で添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  の条件で 48 時間培養した。培養後得られた Con A 刺激細胞  $2 \times 10^5$  に BMMNC を  $2 \times 10^5$  加えて coculture した。その結果は図 1 で示されるように CFU-E については Con A を  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度で刺激した PBMNC を BMMNC と coculture した場合

に% of control CFU-Eは $55 \pm 9\%$ となり最も colony 形成が少なく、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ では $97 \pm 13.4\%$  ( $p < 0.005$ ),  $5.0 \mu\text{g/ml}$ では $84 \pm 10.8\%$  ( $p < 0.05$ ) と  $10 \mu\text{g/ml}$  の Con A 添加と比較して有意差を認めた。しかし  $20 \mu\text{g/ml}$  の Con A 濃度の場合は  $70 \pm 7.4\%$  ( $p > 0.1$ ) で  $10 \mu\text{g/ml}$  の Con A 添加と比較して有意差は認められなかった。また Con A 非刺激細胞との coculture では図左端のカラムに示すようにコントロールに比べ軽度の colony 数の増加がみられた。以上の成績から、本実験における抑制効果を得るための Con A 至適濃度は  $10 \mu\text{g/ml}$  と考えられ、以下の実験ではこの濃度で刺激した PBMNC を Con A 刺激細胞として使用した。

次に Con A 刺激細胞作製の至適培養時間を決定するため以下の実験を行った。同一人物から 96, 72, 48, 24 時間前に採血して得られた PBMNC に Con A を

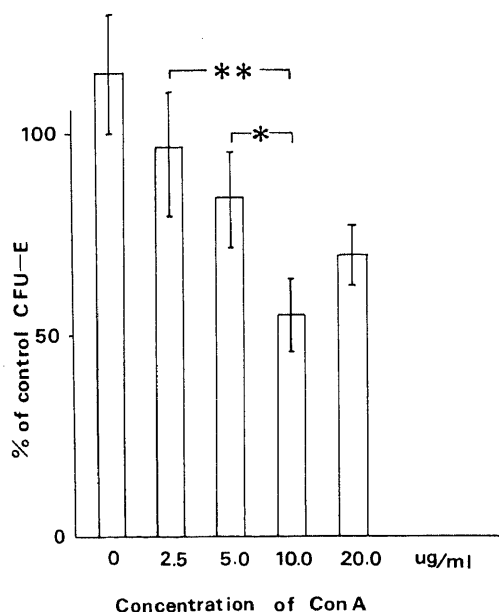


Fig. 1. The optimal concentration of concanavalin A (Con A) for the induction of erythroid colony forming unit (CFU-E)/suppressor cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) were incubated for 48 hr at different concentrations of Con A. After incubation, Con A-stimulated cells were cocultured with normal bone marrow mononuclear cells (BMMNC) at a 1:1 ratio and CFU-E was assayed. Each column represents the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of % of control CFU-E in 5 experiments. Control CFU-E was obtained when BMMNC were cultured without Con A-stimulated PBMNC.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$

$10 \mu\text{g/ml}$  添加後、それぞれ 96, 72, 48, 24 時間培養した後、それぞれの Con A 刺激細胞を同時に採取し、その  $2 \times 10^5$  に対して BMMNC を  $2 \times 10^5$  ずつ加えて coculture を行った。その結果は図 2 で示されるように 48 時間培養して得られた Con A 刺激細胞と BMMNC との coculture で CFU-E の % of control は  $53 \pm 5.2\%$  と最も強い抑制が認められ、一方、24, 72, 96 時間培養して得られた Con A 刺激細胞と BMMNC との coculture の場合と比較すると % of control でそれぞれ  $66 \pm 5.4\%$  ( $p < 0.025$ ),  $70 \pm 5.4$  ( $p < 0.01$ ),  $82 \pm 4.8$  ( $p < 0.005$ ) となりいずれも 48 時間培養時と比べ有意が得られた。そこで以下の実験は Con A 刺激細胞の培養時間を 48 時間とした。

## II. Preincubation の影響

Con A 刺激細胞と BMMNC を coculture する場合、Con A 刺激細胞の CFU-E 抑制効果に対する preincubation の影響を検討した。Con A 刺激細胞と BMMNC をそれぞれ  $2 \times 10^5/\text{ml}$  となるように 15% FCS 加  $\alpha$ -medium に調整し、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  の条件下で 2 時間の preincubation を行った。preincubation 終了後、Con A 刺激細胞と BMMNC がそれぞれ  $2 \times 10^5/\text{ml}$  となるように 15% FCS 加  $\alpha$ -medium に浮遊

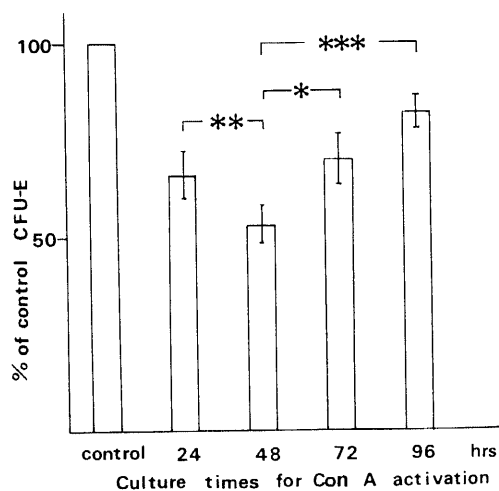


Fig. 2. The optimal incubation time for the induction of Con A-stimulated CFU-E/suppressor cells.

After incubation of PBMNC with  $10 \mu\text{g/ml}$  of Con A for various lengths of time, Con A-stimulated cells were added to normal BMMNC at a 1:1 ratio and CFU-E was assayed. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 4 experiments.

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.025$ , \*\*\* $p < 0.005$

させ CFU-E assay をおこなった。図 3 のごとく CFU-E の形成は preincubation を行った場合  $76 \pm 16\%$ 、行わなかった場合が  $74 \pm 8\%$  となり両者に全く差を認めず、したがって preincubation は CFU-E 形成の抑制に影響しないことが明らかとなったので、以下の実験では preincubation を行わずに coculture による検討を行った。

### III. Con A 刺激細胞の影響

BMMNC  $2 \times 10^5$  に Con A 刺激細胞または Con A 刺激細胞非刺激細胞を 0, 0.5, 1.0, 2.0,  $4.0 \times 10^5$  添加して coculture を行った。結果は図 4 に示されるように Con A 非刺激細胞との coculture ではコントロールに比べ colony の軽度増加傾向を認めたが、有意差はみられなかった。一方、Con A 刺激細胞との coculture では、CFU-E, BFU-E の % of control は Con A 刺激細胞を  $1 \times 10^5$ /ml 添加するとそれぞれ  $76 \pm 19.4\%$ ,  $70 \pm 4.9\%$ ,  $2 \times 10^5$ /ml を添加するとそれぞれ  $59 \pm 14.2\%$ ,  $52 \pm 14.0\%$  となりさらに  $4 \times 10^5$ /ml

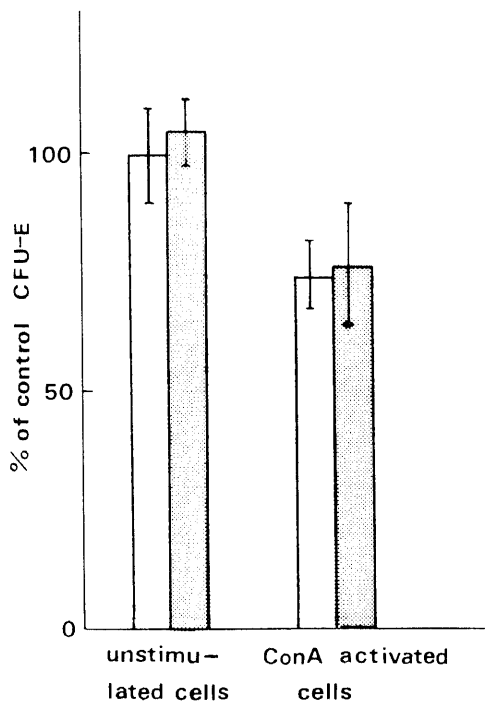


Fig. 3. Effects of 2 hr incubation of BMMNC with Con A-stimulated PBMNC on CFU-E. BMMNC were incubated with unstimulated or Con A-stimulated cells for 2 hr (shaded columns) before CFU-E assay. Open columns indicate the data of CFU-E assays without preincubation. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 5 experiments.

を添加すると  $50 \pm 18.4\%$ ,  $46 \pm 11.2\%$  となり, Con A 刺激細胞は CFU-E, BFU-E に対して dose dependent な抑制を示し、いずれもコントロールに比べ有意の抑制が観察された。しかし、Con A 刺激細胞を  $0.5 \times 10^5$ /ml 添加した場合には、CFU-E, BFU-E ともに軽度減少傾向を示したが、コントロールと比較して有意差は認めなかった。

次に Con A 刺激の PBMNC と BMMNC の提供者とが autologous か, allogeneic かによって抑制の程度に有意な差があるかどうかを検討した。結果は図 5 に示されるように添加する Con A 刺激細胞を変えても, autologous と allogeneic とで抑制効果に差を認めなかった。

### IV. 培養上清の影響

CFU-E, BFU-E に対して抑制作用を有する Con A 刺激細胞から抑制因子が産生されている可能性を明らかにするため、その培養上清のコロニー形成に及ぼす影響を検討した。CFU-E assay, BFU-E assay 系に培養上清を 0, 5, 10, 20% 添加して検討を行った。その結果は図 6 で示されるように Con A 非刺激細胞の培養上清添加した場合にはコントロールと比較して CFU-E および BFU-E 形成に対して明らかな影響を示さなかったが、Con A 刺激細胞の培養上清を添加した場合には CFU-E, BFU-E ともに dose dependent な抑制を受け、20% の培養上清添加時では CFU-E に対して % of control は  $72 \pm 5.8\%$  ( $p < 0.01$ ), BFU-E に対して % of control は  $63 \pm 12\%$  ( $p < 0.005$ ) と有意の抑制がみられた。

次に培養上清に含まれる Con A が BMMNC の中に存在する T 細胞を刺激して抑制することも考えられるので以下の実験を行った。Con A を BMMNC の単独培養系に 1.0, 2.0,  $4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  を直接添加し、その抑制効果を検討した。その結果は図 7 で示されるように、% of control CFU-E は  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $97 \pm 11.3\%$ ,  $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $88 \pm 13.4\%$ ,  $4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $83 \pm 13.2\%$  といずれも有意の抑制はみられなかった。

さらに、図には示していないが BMMNC から PBMNC の場合と同じ方法で T 細胞を除いた T cell depleted BMMNC を用いて培養上清による抑制効果の検討を行ったところ T 細胞を除去しても抑制効果に有意差は認められなかった。

### V. Con A 刺激細胞 T 細胞と non-T 細胞の影響

PBMNC を既に述べたような方法で T 細胞と non T 細胞に分離し、それぞれに Con A  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加し  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の条件で 48 時間培養した。培養後得られた Con A 刺激 T 細胞および non T 細胞を採取し BMMNC との coculture に用いた。その結果は図 8 に

示されるように Con A 刺激 non-T 細胞の添加では CFU-E の抑制は全くみられないのに対して, Con A 刺激 T 細胞を添加した場合には, % of control は  $57 \pm 8.9\%$  となり有意の抑制が認められた. 一方, Con A 刺激を行わない場合は, T 細胞, non-T 細胞の両者とも CFU-E に堪える抑制を示さなかった.

#### VI. Con A 刺激細胞の抗体処理と X 線照射による影響

Con A 刺激細胞の免疫学的特徴を明らかにするため, ALG および T 細胞サブセットに対するモノクローナル抗体との反応性, X 線感受性を検討した. その結果は図 9 に示されるように, 補体のみによる処理では % of control は  $69 \pm 8.5\%$  と無処理の場合 ( $70 \pm 8.2\%$ ) と同様に Con A 刺激細胞の抑制効果に変化を及ぼさないが, ALG および T 101 monoclonal 抗体と補体による処理では, % of control はそれぞれ  $92 \pm 5.7\%$ ,  $97 \pm 7.7\%$  となり, また X 線照射処理では  $92 \pm 5.2\%$  となり, いずれの場合も Con A 刺激細胞の CFU-E に対する抑制効果は消失した.

次に既に述べたような方法で PBMC から T 細胞を分離し, Con A で刺激して得られた T 細胞に対する

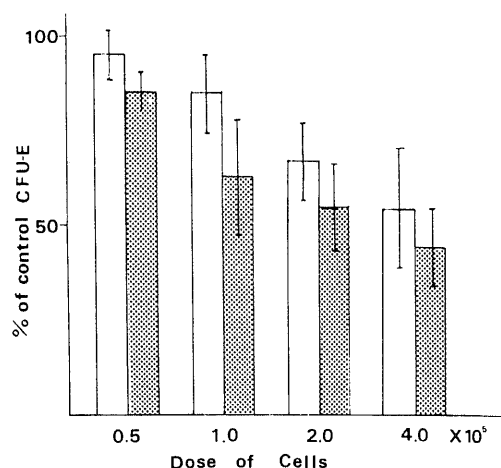


Fig. 5. Effects of Con A-stimulated autologous and allogeneic PBMC on CFU-E.

BMMNC were cocultured with autologous (shaded columns) or allogeneic (open columns) Con A-stimulated cells. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 3 experiments.

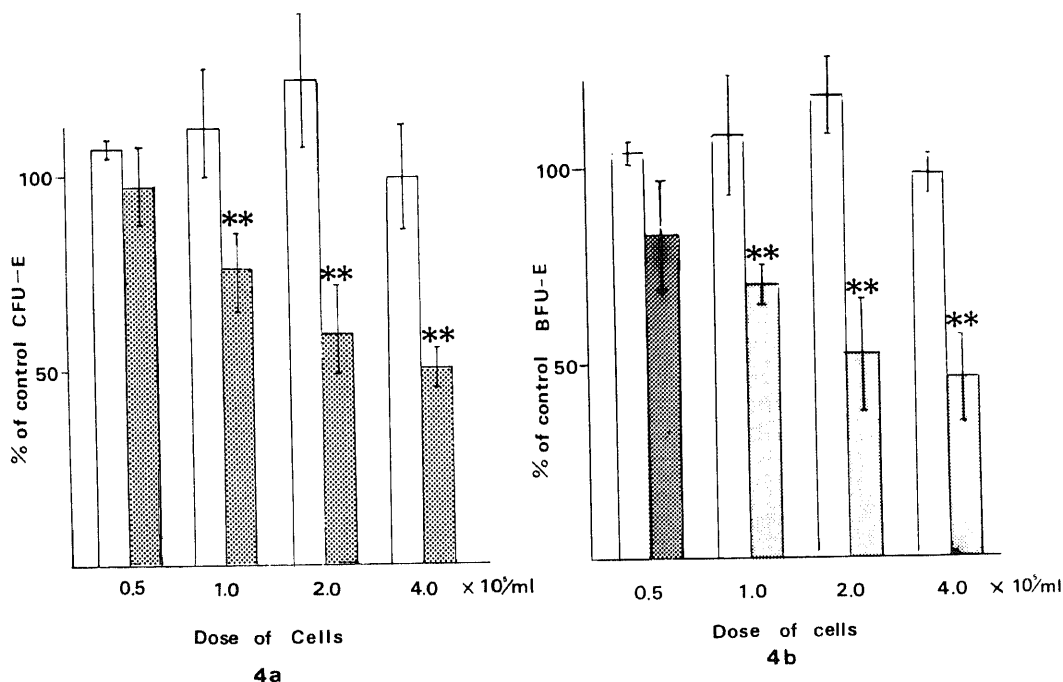


Fig. 4. Dose-dependent inhibitory effects of Con A-stimulated cells on CFU-E (Fig. 4a) and BFU-E (Fig. 4b).

BMMNC were cocultured with various numbers of unstimulated (open columns) or Con A-stimulated (shaded columns) cells. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E and BFU-E in 5 experiments.

\*\* $p < 0.005$

モノクローナル抗体と補体による処理の影響について検討した。Con A 刺激 T 細胞を, OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKIa1 モノクローナル抗体と補体で処理した後, BMMNC と coculture を行うと, CFU-E については図 10 a に示されるように無処理と補体のみによる処理では colony 形成はそれぞれコントロールの  $53 \pm 8.1\%$ ,  $55 \pm 6.2\%$  と Con A 刺激 T 細胞による抑制の解除は認められなかった。しかし monoclonal 抗体による処理では, OKT 3 または OKT 8 と補体との処理によって colony 形成はそれぞれコントロールの  $97 \pm 4.1\%$ ,  $97 \pm 2.4\%$  とほぼコントロールに近い値まで回復し, 抑制が解除された。一方, OKT 4 あるいは OKIa1 と補体との処理では % of control は  $65 \pm 7.1\%$ ,  $69 \pm 11.2\%$  と抑制の程度に変化は認められなかった。BFU-E に関しては, 図 10 b に示されるように, CFU-E の場合と同様に OKT 3 または OKT 8 と補体で処理をおこなうことによって, % of control は  $95 \pm 5.7\%$ ,  $91 \pm 6.9\%$  となり BFU-E 形成はコントロールと同程度の回復を示し, Con A 刺激 T 細胞の抑制が解除された。しかし, OKT 4 あるいは OKIa1 と補体との処理では, CFU-E の場合と同様に抑制の解除は認められなかった。

## VII. 骨髓の adherent cell の影響

Con A 刺激細胞の CFU-E, BFU-E に対する抑制効果が BMMNC 中に含まれる adherent cell 除去によって影響を受けるか否かを検討した。Con 刺激 T 細胞を BMMNC (adherent cell を含む) および既述の方法で adherent cell を除いた non-adherent BMMNC にそれぞれ  $2 \times 10^5$  ずつ添加し coculture を行った。その結果は図 11 で示されるように, BMMNC では CFU-E コントロールの  $54 \pm 7\%$ , BFU-E はコントロールの  $53 \pm 13\%$ , non adherent BMMNC では CFU-E はコントロールの  $62 \pm 3\%$ , BFU-E はコントロールの  $49 \pm 11\%$  と, BMMNC 中の adherent cell 除去による Con A 刺激 T 細胞の CFU-E, BFU-E 抑制効果に及ぼす影響は明らかではなかった。

## VIII. Con A 刺激 OKT 4<sup>+</sup>分画と OKT 8<sup>+</sup>分画の影響

Con A で刺激された OKT 4<sup>+</sup>分画と OKT 8<sup>+</sup>分画の BFU-E と顆粒球/単球の前駆細胞である CFU-C に対する影響について検討をおこなった。既述の方法で採取した Con A 刺激 OKT 4<sup>+</sup>分画および OKT 8<sup>+</sup>分画と骨髓単核球を 1 : 1 の比で coculture をおこなった。結果は図 12 で示されるように Con A 刺激

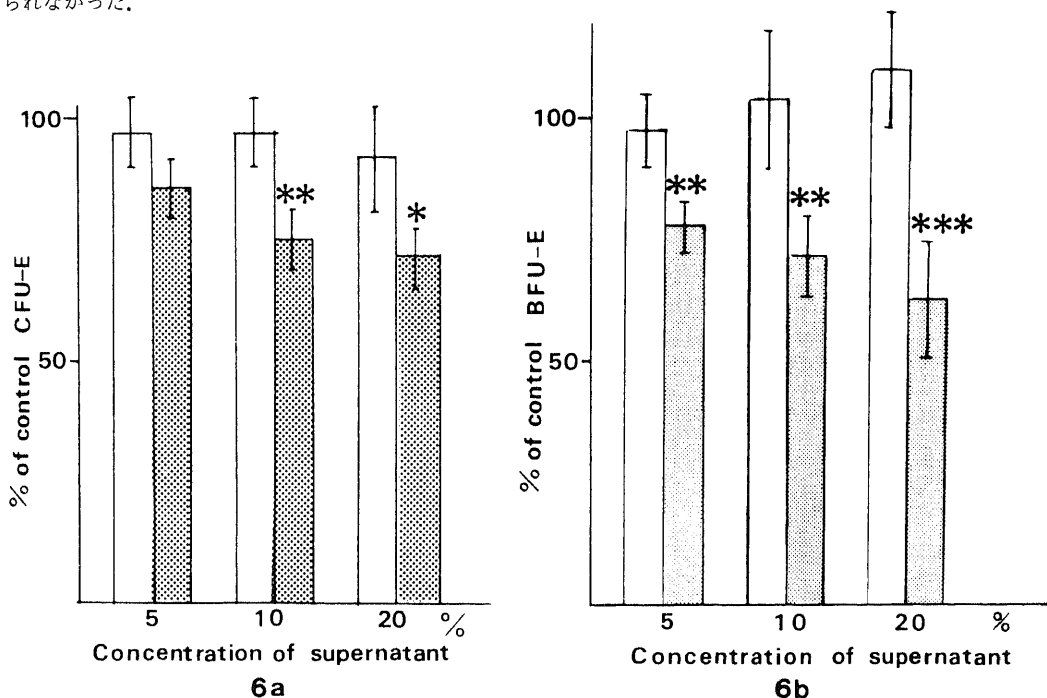


Fig. 6. Effects of supernatants obtained from Con A-stimulated cells on CFU-E (Fig. 6a) and BFU-E (Fig. 6b).

Various concentrations of supernatants obtained from Con A-stimulated (shaded columns) and unstimulated (open columns) cells were added to the assay systems for CFU-E and BFU-E. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E and BFU-E in 4 experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

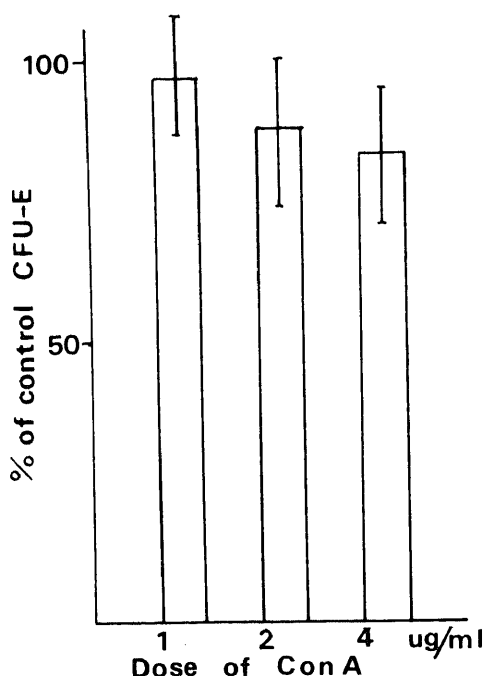


Fig. 7. Effects of Con A concentrations on CFU-E. Various doses of Con A were added to CFU-E assay systems. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 4 experiments.

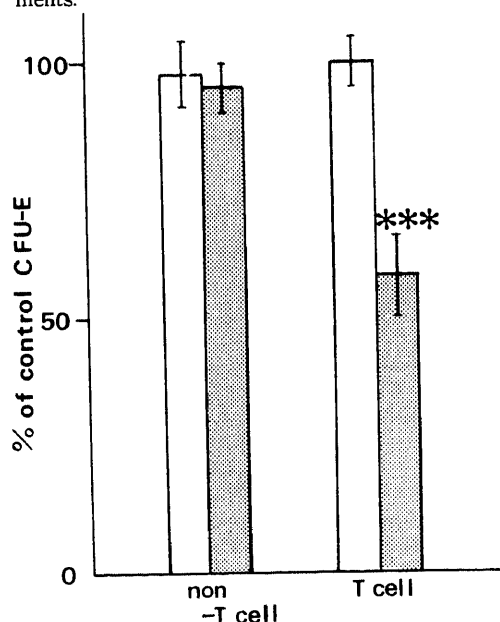


Fig. 8. Effects of Con A-stimulated T or non-T cells on CFU-E.

Open and shaded columns indicate unstimulated and Con A-stimulated cells respectively. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 4 experiments.

\*\*\* $p < 0.005$

OKT 8<sup>+</sup>分画と骨髓単核球との coculture では CFU-E がコントロールの  $72 \pm 9\%$ , BFU-E がコントロールの  $63 \pm 12\%$  と、ともに有意な抑制がみられた。一方、図 13 で示されるように Con A 刺激 OKT 4<sup>+</sup>分画と骨髓単核球との coculture では % of control CFU-C は  $104 \pm 11.3\%$  と全く抑制はみられず、% of control BFU-E は  $83 \pm 22.7\%$  と軽度の抑制傾向が認められたものの有意な抑制ではなかった。

#### 考 察

Con A は pokeweed mitogen (PWM) による in vitro 免疫グロブリン産生やリンパ球混合培養 (mixed leukocyte culture, 以下 MLC と略す) の系で抑制的に作用する suppressor cell を誘導し<sup>21)27)28)</sup>, さらに造血幹細胞に対して顆粒球-マクロファージ系前駆細胞である CFU-C を抑制することが報告されている<sup>29)</sup> が、今回の検討でも、Con A 刺激によって赤芽球系前駆細胞である CFU-E, BFU-E を抑制する suppressor cell が誘導されることが明らかになった。この Con

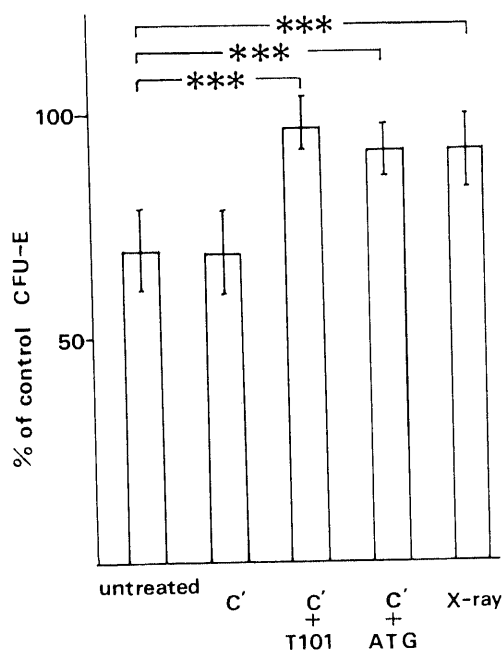


Fig. 9. Effects of Con A-stimulated cells treated with antilymphocyte globulin (ALG), T101 or radiation on CFU-E.

Con A-stimulated cells were treated with ALG or T101 and rabbit complement, or 2000 rad of X-ray radiation before cocultures with BMMNC. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E in 6 experiments.

\*\*\* $p < 0.005$



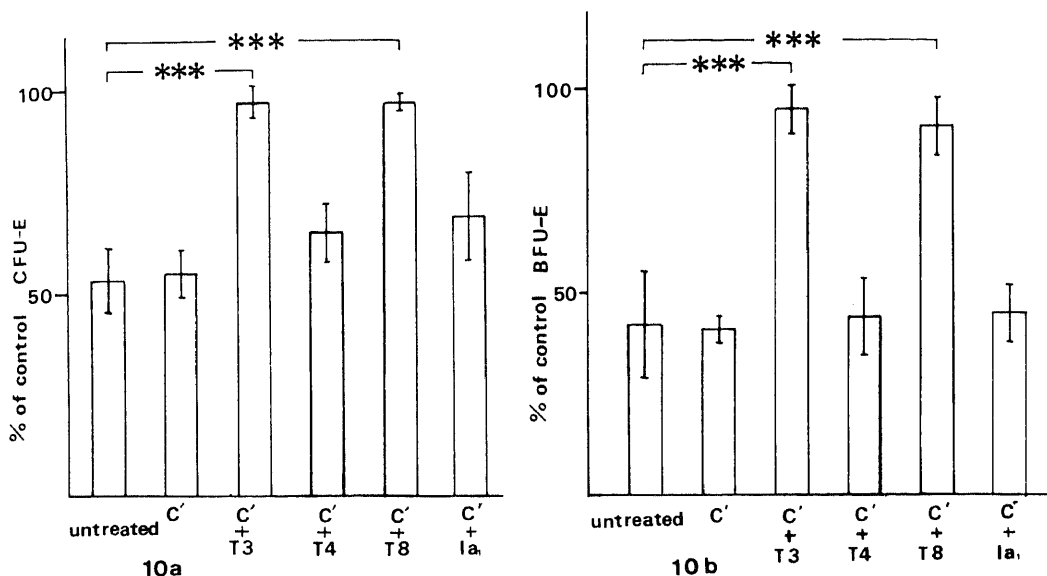


Fig. 10. Effects of Con A-stimulated cells treated with monoclonal antibody and complement on CFU-E (Fig. 10a) and BFU-E (Fig. 10b).

Con A-stimulated cells were treated with OKT3, OKT4, OKT8 or OKIa; antibody and rabbit complement before coculture with BMMNC. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E and BFU-E in 6 experiments.

\*\*\* $p < 0.005$

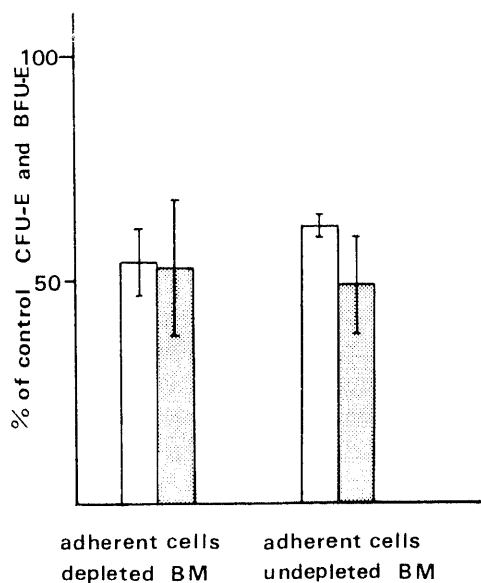


Fig. 11. Effects of macrophage in BMMNC on CFU-E and BFU-E.

Adherent cell-depleted BMMNC were cocultured with Con A-stimulated T cells. Open and shaded columns indicate CFU-E and BFU-E respectively. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-E and BFU-E in 8 experiments.

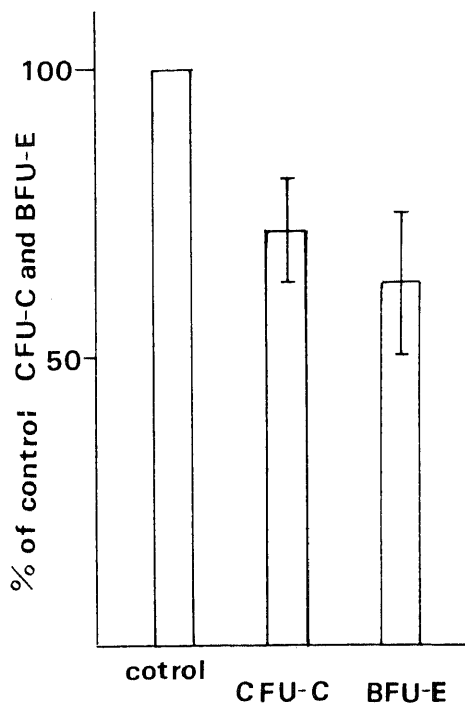


Fig. 12. Effects of Con A-stimulated OKT8-positive cells on CFU-E and BFU-E.

Con A-stimulated OKT8-positive cells were added to normal BMMNC at a 1:1 ratio before CFU-C or BFU-E assays. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-C and BFU-E in 6 experiments.

A 誘導 CFU-E & BFU-E/suppressor cell の特徴は、1) 10  $\mu$ g/ml の Con A 濃度で 48 時間培養した場合に最も強い抑制を示す、2) 放射線感受性の T 細胞である、3) その抑制には液性因子が関与している、4) 抑制細胞と被抑制細胞との間で HLA の一致を必ずしも必要としない、などの点で、これまで報告されてきた Con A 誘導 suppressor cell に一致する特徴をそなえているといえる<sup>21)</sup>。さらに、T 細胞サブセットに対するモノクローナル抗体による細胞表面形質の検索では、Con A 誘導 CFU-E & BFU-E/suppressor cell は、OKT 3, OKT 8 陽性で、OKT 4, OKIa<sub>1</sub> 陰性であることが明らかとなり、これも従来の報告<sup>28)30)</sup>に一致する所見といえる。Ia 抗原に対する monoclonal 抗体と補体による処理では、colony 形成に対する抑制が解除されなかったことにより、Con A 誘導 CFU-E & BFU-E/suppressor T cell は Ia 抗原陰性細胞と考えられる。PBMNC を Con A と 48 時間培養することにより、Ia 抗原陰性細胞は 5~10% に増加するという報告<sup>31)</sup>があり、この点からは Ia 抗原陰性細胞だけでなく

Ia 抗原陽性細胞も抑制的に働いている可能性を完全には否定できない。この点に関してはさらに今後、詳細な検討が必要と思われる。

造血幹細胞に抑制的に働く T 細胞は今回の検討では OKT 3, OKT 8 陽性細胞であることが明らかとなったが、モノクローナル抗体による造血調節作用を有する T 細胞サブセットの検討はあまり詳細におこなわれていないようである。Mangan ら<sup>32)</sup>は OKT 3, OKT 4 陽性細胞が末梢血 BFU-E を促進すると報告し、Bagby<sup>33)</sup>は、再不貧血者において、骨髓中の OKT 3, OKT 8 陽性 T 細胞が自己骨髓細胞の CFU-E を抑制した症例を報告している。これらの報告と今回の検討から、造血幹細胞に抑制的に作用する suppressor cell は OKT 8 陽性の phenotype を有する T 細胞であることが予想され、抑制反応に抑制的に働く suppressor cell とは同じ T 細胞サブセットに属することが示唆される。しかし、Damele ら<sup>34)</sup>は正常人 T 細胞をモノクローナル抗体と補体で処理することにより OKT 4<sup>+</sup>分画と OKT 8<sup>+</sup>分画を採取して、それぞれの Con A 刺激 T 細胞サブセットの MLC および phytohaemagglutinin (PHA) 幼若化反応に対する影響を検討している。その結果、MLC および PHA 反応に対する抑制作用は OKT 8<sup>+</sup>分画だけでなく OKT 4<sup>+</sup>分画にも認められたことから、Con A 誘導 suppressor cells は heterogenous であり、OKT 4<sup>+</sup>分画、OKT 8<sup>+</sup>分画の両者から誘導されうると述べている。

一方、われわれも正常人 T 細胞を OKT 4<sup>+</sup>分画と OKT 8<sup>+</sup>分画に分離し、CFU-C および BFU-E に対する影響について両分画と BMMNC との coculture によって検討をおこなったところ、OKT 8<sup>+</sup>分画は CFU-C、BFU-E 両間に対して有意の抑制を示したのに対し、OKT 4<sup>+</sup>分画は有意の抑制を示さなかった。また CFU-C と BFU-E に対する抑制効果を比較すると BFU-E が強く抑制される傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。したがって、CFU-C および BFU-E に対して抑制作用を発現しうる造血幹細胞抑制性細胞の precursor cell は主に OKT 8<sup>+</sup>分画に存在することが示唆される。しかしながら最近、PWM で刺激された T 細胞サブセットの末梢血 BFU-E に対する影響についての検討がなされ、OKT 4<sup>+</sup>分画のみが明らかな抑制を示したという報告<sup>35)</sup>もみられる。以上のことから、造血幹細胞に抑制的に作用しうる T 細胞には異なった 2 つの phenotype を示す T 細胞サブセット、すなわち OKT 4 陽性細胞と OKT 8 陽性細胞が存在しうることが示され、これは主として mitogen の違いにより誘導される suppressor cell の T 細胞サブセットが異なるという可能性を示唆して

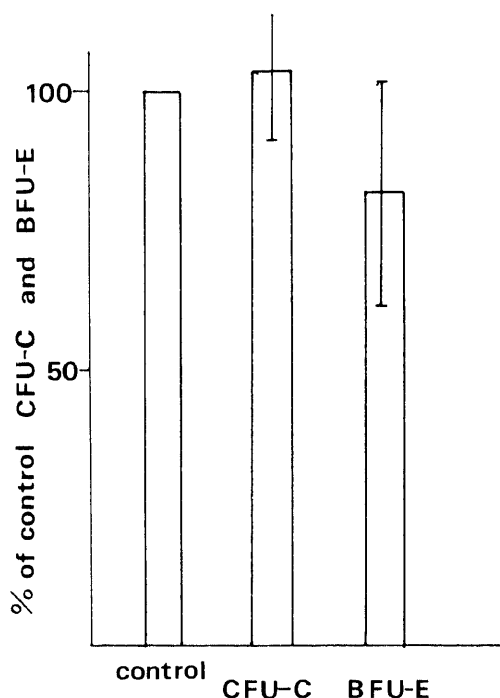


Fig. 13. Effects of Con A-stimulated OKT4-positive cells on CFU-C and BFU-E.

Con A-stimulated OKT4-positive cells were added to normal BMMNC at a 1:1 ratio before CFU-C or BFU-E assay. Each column represents the mean  $\pm$  SD of % of control CFU-C and BFU-E in 8 experiments.

おり、興味深い点と思われる。しかし、このような T 細胞サブセットの抑制作用については mitogen の種類はいうまでもなく培養条件の違い、すなわち mitogen の濃度、培養時間などもかなり影響を及ぼしうることを考慮しなければならない。さらに各 T 細胞サブセットの中に混入している他の T 細胞サブセットの影響についての検討も必要と思われる。たとえば OKT 4<sup>+</sup>分画が抑制作用を示した時、その抑制作用は混入していた OKT 8 陽性細胞の影響を全く無視できるかどうかという点である。たとえば、わずか数%の OKT 8 陽性細胞が抑制的に作用しうる可能性を完全に否定することは困難であるが、OKT 8 陽性細胞の混入する割合を増やして、その抑制の程度を検討することによりある程度明らかにすることができるとと思われる。

また、免疫反応系と造血幹細胞のそれぞれに抑制的に作用する T 細胞サブセットが全く同一か、または同じ phenotype を有するが異なったサブセットかどうかについても今後さらに詳細な検討が必要である。Con A 刺激により免疫反応に抑制作用を発現する T 細胞サブセットは OKT 4<sup>+</sup>分画と OKT 8<sup>+</sup>分画の両分画に存在するが、われわれの検討では、造血幹細胞に抑制的に作用する T 細胞サブセットは OKT 8<sup>+</sup>分画のみ認められている。さらに 1983 年、Bacigalupo ら<sup>36)</sup>は PWM で刺激した正常人あるいは再不貧患者の T 細胞から放出される humoral factor を CFU-C assay 系と PWM 使用の免疫グロブリン産生系に添加培養すると、CFU-C の colony 形成を著明に抑制したが免疫グロブリン産生は全く抑制を示さなかったという。このことは PWM 刺激 T 細胞から産生される humoral factor が造血幹細胞は抑制するが免疫反応系は抑制しないという点で非常に興味ある成績と考えられる。mitogen で刺激された T 細胞からは主に免疫反応系に対して helper factor と suppressor factor の両方を放出すること<sup>37)</sup>がいわれている。PWM は免疫反応での B 細胞の分化に対し抑制または促進因子の両方を放出<sup>38)</sup>し、造血幹細胞では PWM で刺激された T 細胞と BMMNC との coculture で CFU-C を抑制<sup>35)39)</sup>するといわれている。一方、PHA は BFU-E 形成を促進する BPA として PHA-LCM<sup>24)</sup>の形で利用されるが、PHA で刺激された T 細胞と BMMNC との coculture では、CFU-C、CFU-E を抑制することも報告<sup>39)</sup>されている。このように mitogen で活性化されることによりリンパ球はいくつかの機能を獲得し、その作用の違いは mitogen の種類<sup>40)</sup>、その添加濃度<sup>41)</sup>および培養時間<sup>42)</sup>で大きく左右されるものと思われる。またその作用発現には target として使用される

assay 系の違いにより抑制したり促進したりすることも十分考えられる。なぜなら Bacigalupo ら<sup>36)</sup>は PWM で刺激した T 細胞からの humoral factor は CFU-C 形成を抑制するが、免疫グロブリン産生は促進することを述べており、このことは T 細胞から放出される humoral factor が target の違いにより異なる効果を発現する。あるいは 2 つの target specific な humoral factor を産生するという可能性を示唆しており、今後解明すべき重要な点と思われる。次に造血幹細胞抑制の機序についてはまだ十分に明らかにされていないが、今回の検討では cell-to-cell interaction による直接的な抑制効果というよりむしろ液性因子による抑制効果が主体をなしていることが明らかとなった。病的状態において液性因子により造血幹細胞が抑制されるとの報告は CFU-E に関しては、後天性赤芽球癆の患者に IgG 自己抗体の存在が証明され<sup>43)</sup>、CFU-C に関しては血清中の抑制因子の存在が auto immune panleukopenia<sup>44)</sup>、SLE<sup>45)46)47)</sup>および Felty 症候群<sup>48)</sup>などで証明されている。今回の検討でも Con A で刺激細胞の培養上清が CFU-E、BFU-E に対し dose dependent な抑制を示したことから、Con A 誘導 suppressor T cell から造血幹細胞である CFU-E、BFU-E に抑制的に作用する液性因子が産生されていることは容易に推測される。また培養上清中にはわずかに Con A が含まれており、この Con A が骨髓中の T 細胞を刺激した結果、抑制することも考えられるが、この可能性は培養上清中に含まれると同量の Con A を直接に CFU-E assay 系に添加しても有意な抑制は認めていないことから否定される。さらに骨髓から T 細胞を除去しても、除去しない場合と同程度の抑制がみられることから、骨髓 T 細胞が Con A 刺激によって CFU-E、BFU-E を抑制するという可能性はないと思われる。

次に Con A で刺激された T 細胞の BMMNC への直接作用については、coculture する前に Con A 刺激 T 細胞と BMMNC との preincubation によって抑制効果の増大がみられないことより、Con A 刺激細胞と BMMNC の直接的な cell-to-cell interaction は造血幹細胞抑制効果の発現に、それほど重要ではないと考えられる。

またマクロファージの造血幹細胞に対する影響についてはいくつかの報告があり、その作用は prostaglandin E (以下 PG-E と略す) を介しておこなわれるとされている。たとえば Kurland ら<sup>49)</sup>はマウスのマクロファージが赤芽球系前駆細胞の CFU-E、BFU-E を増加させると報告し、さらにマクロファージの培養上清も、顆粒球-マクロファージ前駆細胞である

CFU-Eを抑制し、これにインドメサシンを添加することにより抑制が消失したことから、マクロファージの産生するPG-Eを介してCFU-Eのnegative feed backが行われているのではないかと類推<sup>49)50)</sup>している。1980年、Gordonら<sup>51)</sup>は骨髓マクロファージおよびその培養上清が低濃度(10%まで)ではCFU-EおよびBFU-Eの増加を促し、それ以上の濃度では抑制することを報告した。このようにマクロファージは造血幹細胞に対し、抑制または促進的に作用しうる可能性が示されているが、今回の検討では、Con A刺激細胞のBMMNCに対する抑制効果は、BMMNCからadherent cellを除いても、除かなくても同程度であった。したがって、Con A誘導 suppressor T cellが骨髓中のadherent cellを刺激してCFU-E、BFU-Eを抑制する可能性は否定的と思われる。

最近、今回のわれわれの検討と同様な報告が相ついでなされている。まずPodestaら<sup>39)</sup>はCon A誘導 suppressor cellとその培養上清がCFU-Cに対してきわめて強く抑制作用を示し、その抑制の程度は自己骨髓と同種骨髓のBMMNCとのcocultureでは有意差を認めないと報告している。しかし、Con Aによる suppressor cell誘導の条件はCon Aの至適濃度が50  $\mu\text{g/ml}$ と高濃度で培養時間18時間と短く、われわれの場合それぞれ10  $\mu\text{g/ml}$ 、48時間とかなり異なっている。PodestaらはさらにCon AだけでなくPHA、PWMなどのmitogen刺激によってもCFU-Cを抑制する suppressor cellが誘導されることも認めている。CFU-C抑制の機序としてcolony stimulating factor (CSF)産生細胞を抑制することで間接的にcolonyを抑制する<sup>52)</sup>のか、それとも抑制性因子を放出して抑制する<sup>53)</sup>のかについて、Podestaらは体液性因子が直接造血幹細胞を抑制すると報告している。CFU-Eに関しては、Talleyら<sup>54)</sup>がCon A誘導 suppressor cellについて検討しわれわれと同様な成績を報告しているが、BMMNCの1/3のCon A刺激細胞を添加して%of controlが10%以下という強い抑制を得たという。この場合、Con Aの添加濃度は125  $\mu\text{g/ml}$ ときわめて高濃度であり、培養時間4日と長時間であり、培養条件はわれわれの場合とはかなり異なっている。このように、Con A誘導 suppressor cellはかなりのCon A濃度及び培養時間の違いがあっても誘導されることが考えられる。ただし培養時間に関しては長時間にわたってmitogen刺激を受けたリンパ球からはBPAやCSAが放出されることもあり<sup>37)55)</sup>、このため抑制が十分おこなわれないという可能性も考慮しなければならない。さらに、Talleyら<sup>54)</sup>はautologous MLC, allogeneic MLCやstreptokinase strepto-

dornaseで刺激されたリンパ球がCFU-Eを抑制することを報告している。このように、Con A、PHA、PWMなどのmitogen刺激や、autologous non-T cellおよびalloantigensでリンパ球を刺激することによりCFU-C、CFU-EおよびBFU-Eを抑制する細胞が誘導されるということは、何らかの刺激をうけてはじめて抑制作用を獲得する細胞、いいかえれば造血抑制性T細胞の前駆細胞が正常人にも存在していることを示唆している。一方、Torok-Storbら<sup>56)</sup>は刺激を加えない“resting”の状態にある末梢血T細胞に末梢血BFU-Eを抑制したり、逆にBFU-Eを促進する異なったT細胞サブセットが存在することを明らかにしている。したがって、生体の中では何らかの刺激があつて始めて調節機能を発現するリンパ球と、特に刺激を必要とせずに調節機能を発現しうるリンパ球とが存在するという可能性が考えられる。しかし、このような“resting”状態と考えられるリンパ球も実際には生体の中で既に何らかの刺激をうけて活性化している可能性も否定できない。いずれにせよ、Tリンパ球が造血調節においてamplifierまたはherper<sup>57)58)</sup>としての機能を有することが明らかにされる一方、病的状態ではこの調節機能の喪失、あるいは造血抑制作用を有する suppressor T cellの出現が報告<sup>7)59)</sup>されており、Tリンパ球の造血調節機構への関与が注目される。さらに、suppressor T cellのサブセットについての解析ではCon A誘導 suppressor cell、MLC誘導 suppressor cell<sup>54)59)</sup>さらに再不貧などが認められる suppressor cellがいずれもOKT 3、OKT 8陽性という phenotypeを有するということは免疫応答における suppressor cellsの特徴と矛盾せず、興味深い点と思われる。しかし放射線感受性に関しては、Con A誘導 suppressor cellはsensitiveであるのに対し、MLC誘導 suppressor cellはresistantであること<sup>54)60)</sup>から異なったT細胞サブセットであることも予想され、造血に対する調節性リンパ球にはheterogeneityが存在することが強く示唆される。また、このような造血調節性Tリンパ球の他に単球やマクロファージの造血調節への関心を示唆する報告<sup>49)50)61)</sup>もある。このように、造血調節機構にはT細胞だけでなくnon-T細胞も含む種々の細胞あるいはサブセットが複雑に関与しているものと予想され、今後の詳細な検討によって造血幹細胞の分化、増殖の調節機序が明らかにされれば、治療困難な種々の造血異常の病態や治療法が解明されるものと期待される。

## 結 論

造血幹細胞の分化、増殖を調節する機構に関与する

リンパ球の免疫学的メカニズムを明らかにするため、suppressor T cell を誘導することで知られている Con A により活性化されたリンパ球の CFU-E および BFU-E におよぼす影響を検討し以下の結果を得た。

1. Con A 刺激 suppressor cell は Con A 濃度 10  $\mu\text{g/ml}$ , 培養時間 48 時間で最も強い抑制を示し、赤芽球前駆細胞である CFU-E, BFU-E を dose dependent に抑制した。

2. このように作製された Con A 誘導 suppressor cell は E ロゼット形成細胞分画に存在する T 細胞であり、2000 rad の X 線照射でその抑制作用が消失し、放射線感受性の細胞である。モノクローナル抗体での検索では OKT 3, OKT 8 陽性で、OKT 4, OKIa<sub>1</sub> 陰性細胞であり、さらにこの suppressor cell の precursor cell は OKT 8<sup>+</sup> 分画に存在することが明らかとなった。

3. Con A 誘導 suppressor cell はその抑制作用を発現するために、cell-to-cell interaction を必要とせず、その培養上清が dose dependent な抑制を示すことから、抑制は主に、suppressor cell によって産生される液性因子を介しておこなわれるものと考えられる。また骨髄の adherent cell を除いてもその抑制の程度に有意差は認めず、Con A 誘導 suppressor cell の抑制の機序にはマクロファージの関与の可能性は少ないと思われる。さらに suppressor cell はその抑制作用発現のために、とくに骨髄細胞との HLA の一致を必要としない。

以上のことから Con A 誘導 suppressor cell は赤芽球前駆細胞である CFU-E, BFU-E を dose dependent に抑制し、モノクローナル抗体での検索では OKT 3, OKT 8 陽性細胞であることが明らかとなった。しかし、免疫反応系に関与する Con A 誘導 suppressor cell と造血幹細胞に関与する Con A 誘導 suppressor cell が全く同一の T 細胞サブセットか、それとも同じ phenotype を有するが異なった T 細胞サブセットかは今後の詳細な検討が必要と思われる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部絢一教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御援助を戴いた同内科原田実根講師に深く感謝します。併せて種々の御協力をいただいた同内科免疫グループの諸先生方に感謝の意を表します。

なお本研究の一部は、文部省科学研究費 (57440089, 58010031) ならびに厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班研究費によってなされたものであることを付記し、感謝の意を表わします。

## 文 献

- 1) Pluznik, D. H. and Sachs, L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**, 319-324 (1966).
- 2) Stephenson, J. R., Axelrad, A. A., McLeod, D. D. L. and Shreeve, M. M.: Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1542-1546 (1971).
- 3) Iscove, N. N. and Sieber, F.: Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hematol.*, **3**, 32-43 (1965).
- 4) Nakeff, A., Dick, K. A. and Van Noord, M. J.: Megakaryocytes in agar cultures of mouse bone marrow. *Ser. Haematol.*, **8**, 4-21 (1975).
- 5) Fauser, A. A. and Messner, H. A.: Granulocyte-erythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood*, **52**, 1243-1248 (1978).
- 6) Ascenso, J., Pahwa, R., Kagan, W., Hansen, J., Moore, M. and Good, R.: Aplastic anemia: Evidence for an immunological mechanism. *Lancet*, **27**, 669-671 (1976).
- 7) Hoffman, R., Zanjani, E. D., Lutton, J. D., Zalusky, R. and Wasserman, L. R.: Suppression of erythroid-colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, **296**, 10-13 (1977).
- 8) Takaku, F., Suda, T., Mizoguchi, H., Miuta, Y., Uchino, H., Nagai, K., Kariyone, S., Shibata, A., Akabane, T., Nomura, T. and Maekawa, T.: Effect of peripheral blood mononuclear cells from aplastic anemia patients on the granulocyte-macrophage and erythroid colony formation in samples from normal bone marrow in vitro—a cooperative work. *Blood*, **55**, 937-943 (1980).
- 9) Suda, T., Mizoguchi, H., Miura, Y., Kubota, K. and Takaku, F.: Enhancement of granulocytic colony formation by depletion of phagocytic cells in the bone marrow of patients with idiopathic aplastic anemia. *Exp. Hematol.*, **8**, 659-665 (1980).
- 10) Gluckman, E., Devergie, A. and Faile, A.: Anti-lymphocyte globulin treatment in severe aplastic anemia. Comparison with bone marrow transplantation. Report of 60 cases. *p171-179*,

- Aplastic Anemia, Heimpel, H., Netzel, B. eds., Springer, Berlin, 1979.
- 11) Netzel, B., Haas, R. J. and Helming, M.: Aplastic anemia. Evidence of immunopathomechanisms and successful treatment with absorbed ATG. p 181-191, *ibid.*, (1979).
  - 12) Bagby, G. C., Goodnight, S. H., Mooney, W. 74 M. and Richert-Boe, K.: Prednisolone-responsive aplastic anemia: a mechanism of glucocorticoid action. *Blood*, 54, 322-333 (1979).
  - 13) Baran, D. J., Grinner, P. F. and Klemperer, M. R.: Recovery from aplastic anemia after treatment with cyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.*, 295, 1522-1523 (1976).
  - 14) Thomas, E. D., Storb, R., Gillett, E. R., Longpre, B., Weiden, P. L., Fefer, A., Witherspoon, R., Glift, R. A. and Buckner, C. D.: Recovery from aplastic anemia following attempted marrow transplantation. *Exp. Hemat.*, 4, 97-102 (1976).
  - 15) Terio, M. C. for the UCLA bone marrow transplant team: Autologous bone marrow repopulation following high dose cyclophosphamide and allogeneic marrow transplantation in aplastic anemia. *Exp. Hemat.*, 36, 305-312 (1977).
  - 16) Mathe, G., Amiel, J. L., Schwarzenber, L., Choay, J., Trolard, P., Schneider, M., Hamat, M., Schlumberger, J. R. and Jasmin, Cl.: Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. *Brit. Med. J.*, 2, 131-136 (1970).
  - 17) Speck, B., Gluckman, E., Haak, H. L. and Rood, J. J.: Treatment of aplastic anemia by antilymphocyte globulin with and without allogeneic bone marrow infusion. *Lancet*, 2, 1145-1148 (1977).
  - 18) Camitta, B., O'Reilly, R. J., Sensenbrenner, L., Rapoport, J., Champlin, R., Doney, K., August, C., Hoffman, R. G., Kirkpatrick, D., Stuart, R., Sanotor, G., Parkman, R., Gale, R. P., Storb, R. and Nathan, D.: Antithoracic duct lymphocyte globulin therapy of severe aplastic anemia. *Blood*, 62, 883-888 (1983).
  - 19) Bacigalupo, A., Giordano, D. and Van Lint, M. T.: Bolus methylprednisolone in severe aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, 300, 501-502 (1979).
  - 20) Singer, J. W., Brown, J. E., James, Mc.: The effects of peripheral blood lymphocytes from patients with aplastic anemia on granulocyte colony growth from HLA-matched and mismatched marrows. The effect of transfusion sensitization. *Blood*, 52, 37-46 (1978).
  - 21) Friedman, S. M., Irigoyen, O. H. and Chess, J.: Regulation of human B cell differentiation by T-cell subclass. *Antibody Production in Man*. p 273-289, Academic Press, New York, 1979.
  - 22) Harada, M., Ishino, C., Odaka, K., Matsue, K., Shiobara, S., Kodo, H., Mori, T. and Hattori, K.: Conditions for cryopreservation of human bone marrow for use in autologous transplantation. *Acta Haematol. Jpn.*, 45, 754-762 (1982).
  - 23) Iscove, N. N., Sieber, F. and Winterhalter, K. H.: Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.*, 83, 309-320 (1974).
  - 24) Fauser, A. A. and Messener, H. R.: Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in clones of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, 53, 1023-1027 (1979).
  - 25) Taestle, R. and Royston, I.: Human T-cell antigens defined by monoclonal antibodies. Absence of T-65 on committed myeloid and erythroid progenitors. *Blood*, 56, 943-946 (1980).
  - 26) Reinherz, E. L. and Schlossman, S. F.: Regulation of the immune response-inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings. *N. Engl. J. Med.*, 303, 370-373 (1980).
  - 27) Haynes, B. F. and Fauci, A. S.: Activation of human B-lymphocytes. Concanavalin-A induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal human B-lymphocytes. *J. Immunol.*, 118, 2281-2287 (1977).
  - 28) Reinherz, E. L. and Schlossman, S. F.: Con A-inducible suppression of MLC: Evidence for mediation by the  $TH_2^+$  T-cell subset in man. *J. Immunol.*, 122, 1335-1341 (1979).
  - 29) 尾高和亮・近藤邦夫・中尾真二, 末永孝生・塩原信太郎・上田幹雄・原田実根・服部純一: 活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響-Concanavalin A 誘導 suppressor T cell による CFU-C の抑制. *医学のあゆみ*, 123, 259-261 (1982).
  - 30) Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G.

- and Schlossman, S. F.: A monoclonal antibody reactive with human cytotoxic/suppressor T-cell subset previously defined by a hetero-antiserum termed TH<sub>2</sub><sup>+</sup>. *J. Immunol.*, **124**, 1301-1307 (1980).
- 31) Ko, H. S., Fu, S. M., Winchester, R. J., Yu, D. T. Y. and Kunkel, H. G.: Ia determinant on stimulated human T-lymphocytes. Occurrence on mitogen and antigen activated T cells. *J. Exp. Med.*, **150**, 246-255 (1979).
- 32) Mangan, K. F., Chikkapa, G., Bleler, L. Z., Scharfman, W. B. and Parkinson, D. R.: Regulation of human blood erythroid burst-forming unit (BFU-E) proliferation by T-lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. *Blood*, **59**, 990-996 (1982).
- 53) Bagby, Jr. G. C.: T lymphocytes involved in inhibition of granulopoiesis in two neutropenic patients are of the cytotoxic/suppressor (T3, T8) subset. *J. Clin. Invest.* **68**, 1597-1600 (1981).
- 34) Damle, N. K. and Gupta, S.: Heterogeneity of concanavalin A-induced suppressor T cells in man defined with monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, **48**, 581-588 (1982).
- 35) 坂巻壽・山崎竜弥・浜口裕之・間柴・斎藤憲治・榎原英夫・古沢新平・大戸英雄: T細胞サブセットのBFU-Eに及ぼす影響-PWN刺激OKT4+分画のBFU-E抑制. *医学のあゆみ*, **126**, 1039-1041 (1983).
- 36) Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Melioli, G., Frassoni, F., Podesta, M., Moretta, L., Van Lint, M. T. and Marmont, A. M.: Generation of CFU-C suppressor T cells in vitro: VII T derived colony inhibitory activity (Td/CIA) has no suppressor effect on in vitro immunoglobulin production. *Exp. Hemat.*, **11**, 506-511 (1983).
- 37) Herscovitz, H. B., Sakane, T., Steinberg, A. D. and Green, I.: Heterogeneity of human suppressor cells induced by concanavalin-A as determined in simultaneous assay of immune function. *J. Immunol.*, **124**, 1403-1410 (1980).
- 38) Moretta, L., Mingari, M. C., Moretta, A. and Cooper, M. D.: Human T lymphocyte subpopulations: studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T dependent B cell differentiation induced by PWM. *J. Immunol.*, **122**, 984-990 (1979).
- 39) Podesta, M., Frassoni, F., Van Lint, M. T., Piaggio, G., Marmont, A. and Bacigalupo, A.: Generation of CFU-C suppressor T-cells in vitro. Effect of PHA, PWM and Con A on bone marrow and peripheral blood lymphocytes from healthy donors. *Exp. Hematol.*, **10**, 256-262 (1982).
- 40) De Martino, J. L. and Humpherys, R. E.: A 35,000 dalton T cell supernatant protein associated with suppression of mitogenic responses. *Thymus*, **2**, 339-353 (1981).
- 41) Dwyer, J. M., Johnson, C. and Desales, M.: Behaviour of human immunoregulatory cells in coculture. Variables requiring consideration for clinical studies. *Clin. Exp. Immunol.*, **38**, 499-513 (1979).
- 42) Podestá, M., Frassoni, F., Van Lint, M. T. and Bacigalupo, A.: Generation of CFU-C suppressor T cells in vitro. IV. Effect of time on the inhibitory activity of mitogen primed normal T lymphocytes. *Thymus*, **4**, 233-242 (1982).
- 43) Krantz, S. B.: Studies on red cell aplasia. Treatment with immunosuppressive drugs. International Conference on Hematopoiesis. Gordon, A. S. (1972).
- 44) Cline, M. J., Opelz, G., Saxon, A., Fahey, J. L. and Golde, D. W.: Autoimmune panleukopenia. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1489-1493 (1976).
- 45) Duckhan, D. J., Rhyne, R. L., Smith, F. E. and Williams, R. C.: Retardation of colony growth of in vitro bone marrow culture using sera from patients with Felty's syndrome, disseminated lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis and other disease states. *Arthritis. Rheum.*, **18**, 323-335 (1975).
- 46) Fitch, J. J., Gale, R. P., Golde, D. W. and Cline, M. J.: Immune suppression of hematopoiesis. *Clin. Res.*, **25**, 475A (1977).
- 47) Fitch, J. J., Cline, M. J., Saxon, A. and Golde, D. W.: Serum inhibitors of hematopoiesis in a patient with aplastic anemia and systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.*, **66**, 537-542 (1979).
- 48) Kurland, J. I., Meyers, P. A. and Moore, M. A. S.: Synthesis and release of erythroid colony and burst-promoting activities by populations of murine peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.*, **151**, 839-852 (1980).
- 49) Kurland, J. I. and Moore, M. A. S.: Modulation of hemopoiesis by prostaglandins. *Exp.*

- 47, 433-442 (1981).  
Hematol., 5, 357-373 (1977).
- 50) Kurland, J. I., Broxmeyer, H. E., Pelus, L. M., Bockman, R. S. and Moore, A. S.: Role for monocyte macrophage-derived colony stimulating factor and prostaglandin-E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. Blood., 52, 388-407 (1978).
- 51) Gordon, L., Miller, W. J., Branda, R. F., Zanjani, E. D. and Jacob, H. S.: Regulation of erythroid colony formation by bone marrow macrophage. Blood, 55, 1047-1050 (1980).
- 52) Verma, D. A., Spitzer, D., Zander, A. R., Beran, M., Dicke, K. A. and McCredie, K. B.: Monocyte-macrophage interaction with putative helper and suppressor T lymphocytes in colony stimulating activity elaboration. p 139-150, In: Baum, S. J., Ledney, G. D. and Khan, A., Experimental Hematology, Tokyo, 1981. Basel, New York: Karger, S. and Steinberg, H., 1981.
- 53) Bacigalupo, A., Podesta, M., Mingari, M. C., Moretta, L., Piaggio, G., Van Lint, M. T., Durand, A. and Marmont, A. M.: Generation of CFU-C/suppressor T cells in vitro: An experimental model for immune-mediated marrow failure. Blood, 57, 491-496 (1981).
- 54) Talley, R., Rinehart, J. J. and Balcerzak, S. P.: Autologous and allogeneic suppressor lymphocyte inhibition of human erythroid colony forming unit proliferation. Exp. Hematol., 10, 505-515 (1982).
- 55) Aye, M. T., Nho, Y., Till, J. E. and McCulloch, E. A.: Studies on leukemic cell populations in culture. Blood, 44, 205-210 (1974).
- 56) Torok-Storb, B., Martin, P. J. and Hansen, J. A.: Regulation of in vitro erythropoiesis by normal T cells: Evidence for two T-cell subset with opposing function. Blood, 58, 171-174 (1981).
- 57) Nathan, D. G., Chess, L., Hillman, D. G., Clark, B., Breard, J., Merler, E. and Housman, D. E.: Human erythroid burst-forming unit: T-cell requirement for proliferation in vitro. J. Exp. Med., 147, 334-339 (1978).
- 58) Goodman, J. W., Basford, N. L., Shipcock, S. G. and Chambers, Z. E.: An amplifier cell in hemopoiesis. Exp. Hematol., 6, 151-160 (1978).
- 59) Amare, M., Abdou, N. L., Robinson, M. G. and Abdou, N. I.: Aplastic anemia associated with bone marrow suppressor T-cell hyperactivity: Successful treatment with antithymocyte globulin. Am. J. Hematol., 5, 25-32 (1978).
- 60) 中尾真二・上田幹雄・近藤邦夫・尾高和亮・塩原信太郎・末永孝生・石野千津子・原田実根・服部純一: 活性化リンパ球の造血幹細胞に及ぼす影響—同種抗原刺激リンパ球による CFU-C の抑制. 医学のあゆみ, 152, 1012-1014 (1983).
- 61) Suda, T., Mizoguchi, H., Miura, Y., Kubota, K. and Takaku, F.: Suppression of in vitro granulocyte-macrophage colony formation by the peripheral mononuclear phagocytic cells of patients with idiopathic aplastic anemia. Br. J. Haematol., 47, 433-442 (1981).

**Effects of Activated Lymphocytes on Hematopoietic Stem Cells: Suppression of Erythroid Progenitor Cells by Concanavalin A-Induced Suppressor T cells** Kunio Kondo, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., 92, 925-941 (1983)

**Key words:** Concanavalin A, Suppressor cell, Erythroid progenitor cell, Monoclonal antibody.

#### Abstract

In the present study, we investigated the effects of human peripheral blood lymphocytes stimulated by concanavalin A (Con A) on erythroid stem cells. Con A-stimulated lymphocytes were cocultured with normal bone marrow cells and erythroid progenitor cells, erythroid colony forming unit (CFU-E) and erythroid burst forming unit (BFU-E), were assayed by using the methylcellulose method. Con A-stimulated lymphocytes showed significant suppression of CFU-E and BFU-E in a dose-dependent manner. This suppressive activity of Con A-stimulated lymphocytes was mediated by humoral factors produced by them. These Con A-induced CFU-E



and BFU-E / suppressor cells were characterized. The results indicate that the Con A-induced suppressor cells are radiosensitive T cells and they have a phenotype of suppressor / cytotoxic T cell subset when studied by monoclonal antibodies specific for T cell differentiation antigens. In addition, cell-to-cell interaction or HLA restriction was not required when Con A-stimulated lymphocytes exerted suppressor activity. These observations suggest that in vitro hematopoiesis is regulated at least in part by activated T cells with a suppressor / cytotoxic phenotype.